Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 81 del 24 marzo 1977

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA ROMA - Giovedì, 24 marzo 1977 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE DELLE LEGGI E DECRETI - TELEFONO 6540139
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA GIUSEPPE VERDI, 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 8508

DECRETO MINISTERIALE 30 settembre 1976.

Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico" - Supplemento n. 3.

LEGGI E DECRETI

DECRETO MINISTERIALE 30 settembre 1976.

Approvazione dei « Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico » - Supplemento n. 3.

IL MINISTRO
PER L'AGRICOLTURA E LE FORESTE

DI CONCERTO CON

I MINISTRI PER LE FINANZE, PER L'INDUSTRIA, IL COMMERCIO E L'ARTIGIANATO E PER LA SANITÀ

Visto l'art. 33 del regio decreto 31 dicembre 1925, n. 2594, contenente norme per il funzionamento delle *stazioni di prove agrarie e speciali*, col quale si stabilisce che le stesse stazioni debbono seguire metodi di analisi determinati da questo Ministero;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 23 novembre 1967, n. 1318, contenente norme per il riordino della sperimentazione agraria;

Visto l'art. 43 del regio decreto-legge 15 ottobre 1925, n. 2033, convertito nella legge 18 marzo 1926, n. 562, riguardante la repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari e l'art. 108 del regolamento per la esecuzione dello stesso regio decreto-legge, approvato con regio decreto 1° luglio 1926, n. 1361, i quali prescrivono che le analisi occorrenti in applicazione delle norme contenute nel regio decreto-legge e nel regolamento suddetti dovranno essere eseguite, dai laboratori incaricati, con i metodi prescritti da questo Ministero, di concerto con quelli delle finanze e della sanità.

Visto il decreto ministeriale 9 novembre 1971, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 308 del 6 dicembre 1971, con il quale sono stati approvati i « Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico »;

Visto il decreto ministeriale 9 febbraio 1972, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 82 del 27 marzo 1972, con il quale è stato approvato il supplemento n. 1 ai metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico;

Viste la VI direttiva della commissione (CEE) del 20 dicembre 1974 (75/84/CEE) pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* delle Comunità europee n. L32 del 5 febbraio 1975 e la VII direttiva della commissione (CEE) del 1° marzo 1976 (76/372/CEE), pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* delle Comunità europee n. L102 del 15 aprile 1976, con le quali vengono fissati alcuni metodi di analisi comunitari per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali;

Ritenuto necessario adottare le opportune disposizioni per conformare le norme nazionali a quelle delle predette direttive comunitarie;

Sentito il parere della commissione per l'aggiornamento dei metodi ufficiali di analisi relativi ai prodotti agrari e sostanze di uso agrario, di cui al decreto ministeriale 18 febbraio 1966, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 188 del 30 luglio 1966;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i « Metodi ufficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico » descritti nel supplemento n. 3 allegato al presente decreto.

Art. 2.

Il testo del Metodo ufficiale di analisi per la determinazione delle sostanze ad attività estrogena nei mangimi e negli integratori, descritto nel supplemento n. 1 ai metodi uficiali di analisi degli alimenti per uso zootecnico è modificato come segue:

L'espressione « Ma = media pesi degli uteri delle rattine del gruppo alimentato con il campione in esame », di cui al punto « 4) valutazione dei risultati » è sostituita con la seguente: « Ma = media pesi degli uteri dei soggetti del gruppo alimentato con il campione in esame ».

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 30 settembre 1976

Il Ministro per l'agricoltura e le foreste
MARCORA

Il Ministro per le finanze
PANDOLFI

Il Ministro per l'industria, il commercio e l'artigianato
DONAT-CATTIN

Il Ministro per la sanità
DAL FALCO

METODI UFFICIALI DI ANALISI
DEGLI ALIMENTI PER USO ZOOTECNICO

SUPPLEMENTO N. 3

Determinazione del buchinolato.
Determinazione della sulfachinossalina.
Determinazione del furazolidone.
Determinazione della aflatossina B_1 (metodo *A*).
Determinazione della aflatossina B_1 (metodo *B*).

Determinazione del buchinolato

(4-idrossi-6,7-diisobutossi-3-chinolin-carbossilato di etile)

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il metodo permette di determinare il contenuto di buchinolato negli alimenti per gli animali, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore d'applicabilità è di 10 ppm. Il decochinato interferisce nella determinazione.

2. PRINCIPIO.

Il campione è sottoposto ad estrazione con cloroformio. L'estratto è evaporato a secco, il residuo è ripreso con cloroformio e la soluzione viene quindi sottoposta a cromatografia su strato sottile. Il buchinolato è eluito con l'etanolo e determinato spettrofotofluorimetricamente in confronto con soluzioni di riferimento.

3. REATTIVI.

3.1. *Cloroformio p.a.*

3.2. *Etanolo* 96 % (v/v) *p.a.*

3.3. *Miscela di cloroformio e etanolo*: mescolare 10 volumi di cloroformio (3.1.) e 1 volume di etanolo (3.2.).

3.4. *Etanolo* 80 % (v/v) *p.a.*

3.5. *Gel di silice G per cromatografia su strato sottile.*

3.6. *Sostanza tipo*: buchinolato puro.

3.7. *Soluzioni di riferimento*:

3.7.1. Soluzione di riferimento contenente 0,2 mg di buchinolato per ml: pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 50 mg di sostanza tipo (3.6.). Sciogliere il cloroformio (3.1.) in un pallone tarato da 250 ml, riscaldando su bagno d'acqua a 50° C. Lasciar raffreddare a temperatura ambiente, portare a volume con cloroformio (3.1.) e omogeneizzare.

3.7.2. Soluzioni di riferimento di lavoro: Prelevare volumi di 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 e 25,0 ml della soluzione (3.7.1.) e introdurli in palloncini tarati da 25 ml. Portare a volume con il cloroformio (3.1.) e omogeneizzare. Queste soluzioni contenenti rispettivamente 0,04 - 0,08 - 0,12 - 0,16 e 0,20 mg di buchinolato per ml, debbono essere preparate al momento dell'impiego.

4. APPARECCHIATURE.

4.1. *Beute da 50 e 250 ml, con tappo a smeriglio.*

4.2. *Agitatore.*

4.3. *Centrifuga, con provette da 15 ml, munite di tappi.*

4.4. *Bagno d'acqua a 50° C.*

4.5. *Apparecchiatura per cromatografia su strato sottile.*

4.6. *Lastre di vetro per cromatografia su strato sottile*, 200 × × 200 mm, preparate come segue: stendere uniformemente sulle lastre uno strato di 0,5 mm di spessore di gel di silice G (3.5.) e lasciar asciugare per 15 minuti all'aria. Indi tenere le lastre per 2 ore nella stufa (4.11.), e trasferirle in un essiccatore munito di gel di silice disidratante. Le lastre in commercio, già pronte all'impiego, sono convenienti nella misura in cui danno risultati simili a quelli delle lastre trattate come indicato qui sopra.

4.7. *Micropipette* da 0,50 ml.

4.8. *Raccoglitore di zone per la cromatografia su strato sottile.*

4.9. *Lampada UV a bassa lunghezza d'onda.*

4.10. *Spettrofotofluorimetro munito di una lampada a Xeno e di 2 monocromatori.*

4.11. *Stufa munita di un ventilatore e regolata a* 100° *C.*

4.12. *Evaporatore rotante sotto vuoto con palloni da 250 ml.*

5. MODO DI OPERARE.

5.1. *Preparazione del campione.*

Macinare il campione in modo che passi totalmente attraverso un setaccio a maglie di 1 mm (conforme alla raccomandazione ISO R 565).

5.2. *Estrazione.*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, una quantità del campione, macinato ed omogeneizzato, che contenga circa 1,25 mg di buchinolato. Introdurre la quantità prelevata in una beuta da 250 ml (4.1.) e aggiungere 100,0 ml di cloroformio (3.1.). Mescolare, tappare la beuta e agitare per 1 ora mediante l'agitatore (4.2.). Lasciare decantare, filtrare ed eliminare i primi ml del filtrato.

Trasferire 80,0 ml del filtrato limpido in un becher da 150 ml, o in un pallone evaporatore rotante (4.12.).

Evaporare quasi a secco su bagno d'acqua (4.4.), riprendere il residuo oleoso più volte con 1-2 ml di cloroformio (3.1.) e travasare quantitativamente i liquidi in un palloncino tarato da 10 ml con l'aiuto di un imbuto a gambo sottile. Portare a volume con cloroformio (3.1.) ed omogeneizzare. Se la soluzione non è limpida, centrifugare per 3 minuti a 3000 giri al minuto in provette munite di tappo.

5.3. *Cromatografia su strato sottile.*

Deporre, sotto forma di punti su una lastra cromatografica (4.6.), mediante micropipetta (4.7.), a distanze rispettive di 2 cm, volumi di 0,25 ml dell'estratto ottenuto in 5.2. e delle 5 soluzioni di riferimento di lavoro (3.7.2.).

Sviluppare il cromatogramma con cloroformio (3.1.) fino a che il fronte del solvente raggiunga praticamente il bordo superiore della lastra, indi essiccare con l'aiuto di una corrente d'aria. Sviluppare con la miscela cloroformio/etanolo (3.3.) fino a che il fronte del liquido solvente sia migrato di circa 12 cm. Lasciare asciugare la lastra. Irradiare il cromatogramma con la luce UV (4.9.) e delimitare le macchie di buchinolato (valore Rf: 0,4-0,6) con l'aiuto di un ago.

5.4. *Eluizione.*

Raccogliere la silice di ognuna delle zone delimitate, mediante un raccoglitore di zona (4.8.), in provette da centrifuga (4.3.). Aggiungere in ogni provetta 10,0 ml d'etanolo (3.4.), agitare per 20 minuti, indi centrifugare per 5 minuti a 3000 giri al minuto. Decantare le soluzioni limpide in beute da 50 ml (4.1.).

5.5. *Misura della fluorescenza.*

Tarare lo spettrofotofluorimetro (4.10.) al 100 % di trasmittanza sull'eluato (5.4.) proveniente dalla soluzione di riferimento più concentrata, utilizzando per l'eccitazione la lunghezza d'onda compresa tra 200 e 280 nm che dà il massimo di fluorescenza, e per l'emissione la lunghezza d'onda di 375 nm.

Misurare quindi l'intensità della fluorescenza degli altri eluati (5.4.). Determinare dai valori trovati la quantità (A) di buchinolato in mg contenuta nei 10 ml d'eluato proveniente dal campione.

6. CALCOLO DEI RISULTATI.

La concentrazione del buchinolato in mg per kg di campione è data dalla formula:

$$\frac{A}{P} \cdot 50.000$$

in cui:

A = quantità in mg di buchinolato determinata con la misura spettrofluorimetrica;

P = peso in grammi del campione prelevato per l'analisi.

7. RIPETIBILITÀ.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

50 %	del risultato più elevato per concentrazioni di buchinolato comprese tra 10 e 20 ppm;
10 ppm,	in valore assoluto, per le concentrazioni comprese tra 20 e 100 ppm;
10 %	del risultato più elevato per le concentrazioni comprese tra 100 e 5000 ppm;
500 ppm,	in valore assoluto, per le concentrazioni comprese tra 5000 e 10000 ppm;
5 %	del risultato più elevato per le concentrazioni superiori a 10000 ppm.

Determinazione della sulfachinossalina

(2-sulfanilammido-chinossalina)

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il metodo permette di determinare il contenuto di sulfachinossalina negli alimenti per gli animali, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore di applicabilità è di 20 ppm. Le altre sulfanilammidi e l'acido arsanilico interferiscono nel dosaggio.

2. PRINCIPIO.

Il campione è sottoposto ad estrazione con dimetilformammide e cloroformio. La sulfachinossalina è idrolizzata in mezzo alcalino. Dopo neutralizzazione, il derivato amminico che si forma viene diazotato e copulato con N-(1,naftil) etilendiammina. La densità ottica della soluzione è misurata a 545 nm.

3. REATTIVI.

3.1. *N,N-dimetilformammide p.a.*

3.2. *Cloroformio p.a.*

3.3. *Etanolo assoluto.*

3.4. *Soluzione alcalina*: sciogliere in acqua 10 g di idrossido di sodio p.a. e 25 g di cloruro di sodio p.a. Portare a 500 ml con acqua e mescolare.

3.5. *Acido cloridrico concentrato p.a.* (d = 1,18).

3.6. *Soluzione allo 0,1 % (p/v) di nitrito di sodio*: sciogliere nell'acqua 100 mg di nitrito di sodio p.a., portare a 100 ml con acqua e mescolare. Da preparare immediatamente prima dell'impiego.

3.7. *Soluzione allo 0,5 % (p/v) di solfammato d'ammonio*: sciogliere in acqua 500 mg di solfammato d'ammonio p.a., portare a 100 ml con acqua e mescolare. Da preparare immediatamente prima dell'impiego.

3.8. *Soluzione allo 0,1 % (p/v) di dicloridrato di N-(1-naftil) etilendiammina*: sciogliere in acido cloridrico (3.5.) allo 0,1 % (v/v) 100 mg di dicloridrato di N-(1-naftil) etilendiammina p.a., portare a 100 ml con lo stesso acido e mescolare. Da preparare immediatamente prima dell'impiego.

3.9. *Sostanza tipo*: sulfachinossalina pura.

3.10. *Soluzione di riferimento*: pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 250 mg di sostanza tipo (3.9.). Sciogliere in 50 ml di una soluzione di idrossido di sodio (25 ml di soluzione 0,1 N di idrossido di sodio p.a. più 25 ml d'acqua), portare a 500 ml con acqua e mescolare. 5 ml di questa soluzione vengono portati a 100 ml con acqua. 1 ml di questa soluzione contiene 25 µg di sulfachinossalina.

4. APPARECCHIATURA.

4.1. *Beute da 250 ml, con tappo a smeriglio normalizzato.*

4.2. *Agitatore.*

4.3. *Crogiolo filtrante, porosità G3, diametro 80 mm, con beuta da vuoto.*

4.4. *Imbuti separatori da 250 ml.*

4.5. *Palloni tarati da 50, 100, 250 e 500 ml.*

4.6. *Provette, 150 mm × 25 mm.*

4.7. *Bagno d'acqua bollente.*

4.8. *Spettrofotometro con vaschette di 20 mm di cammino ottico.*

5. MODO DI OPERARE.

5.1. *Preparazione del campione.*

Macinare il campione in modo che passi totalmente attraverso un setaccio a maglie di 1 mm (conforme alla raccomandazione ISO R 565).

5.2. *Estrazione.*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, una quantità del campione, macinato e omogeneizzato, che contenga da 0,25 a 1,25 mg di sulfachinossalina. Introdurre la quantità prelevata in una beuta da 250 ml (4.1.) e aggiungere 20 ml di N,N-dimetilformammide (3.1.). Mescolare e riscaldare per 20 minuti su bagno d'acqua (4.7.). Raffreddare sotto una corrente d'acqua fredda. Aggiungere 60 ml di cloroformio (3.2.), tappare la beuta e agitare per 30 minuti mediante l'agitatore (4.2.). Filtrare il liquido attraverso un crogiolo filtrante (4.3.), sotto leggera aspirazione. Lavare la beuta per 4 volte con 5 ml di cloroformio (3.2.) per volta e versare i liquidi nel crogiolo filtrante. Travasare indi il filtrato dal recipiente di raccolta in un imbuto separatore (4.4.), lavare il recipiente di raccolta con circa 15 ml di cloroformio (3.2.) e travasare anche questi nell'imbuto separatore.

5.3. *Idrolisi.*

Versare nell'imbuto separatore 50 ml di soluzione alcalina (3.4.) e 5 ml di etanolo (3.3.). Mescolare completamente sia capovolgendo l'imbuto una ventina di volte, sia facendolo girare attorno all'asse orizzontale passante dal gambo al tappo, evitando la formazione di emulsione. Lasciare quindi riposare fino a separazione delle fasi (la separazione è generalmente completa dopo circa 15 minuti).

Travasare la fase superiore (fase acquosa) in un pallone tarato da 250 ml (4.5.). Estrarre di nuovo la fase cloroformica con 3 porzioni successive di 50 ml di soluzione alcalina (3.4.) e travasare, dopo ogni estrazione, l'estratto acquoso nel pallone tarato. Portare a volume con acqua e mescolare.

Introdurre 25,0 ml della soluzione in un pallone tarato da 50 ml (4.5.), aggiungere 5,0 ml d'acido cloridrico (3.5.), portare a volume con acqua e mescolare. Se necessario, filtrare ed eliminare i primi 15 ml del filtrato. Introdurre 10,0 ml della soluzione rispettivamente in 2 provette (4.6.) A e B.

5.4. *Sviluppo della colorazione e misura della densità ottica.*

Aggiungere in ciascuna delle provette 2,0 ml di soluzione di nitrito di sodio (3.6.), agitare e lasciar riposare 3 minuti. Aggiungere 2,0 ml di soluzione di solfammato d'ammonio (3.7.) agitare e lasciar riposare 2 minuti. Aggiungere quindi 1,0 ml di soluzione di dicloridrato di N-(1-naftil)etilendiammina (3.8.) nella provetta A e 1,0 ml di acqua nella provetta B. Mescolare intimamente il contenuto di ciascuna provetta. Collegare le provette a una pompa ad acqua mediante giunti di gomma ed eliminare l'azoto disciolto sotto leggera aspirazione.

Misurare dopo 10 minuti le densità ottiche E_A ed E_B delle soluzioni allo spettrofotometro (4.8.) a 545 nm usando acqua come bianco.

Determinare dal valore E_A-E_B la quantità (A) di sulfachinossalina presente nella soluzione del campione, riferendosi alla curva di taratura (5.5.) disegnata preliminarmente.

5.5. *Curva di taratura.*

Introdurre in palloni tarati da 100 ml (4.5.) ml 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 e 10,0 della soluzione di riferimento (3.10.) corrispondenti rispettivamente a 50, 100, 150, 200 e 250 microgrammi di sulfachinossalina. Aggiungere 8 ml d'acido cloridrico (3.5.) in ogni palloncino, portare a volume con acqua e mescolare.

Prelevare 10,0 ml da ogni soluzione (corrispondenti rispettivamente a 5, 10, 15, 20, 25 microgrammi di sulfachinossalina) e introdurli in provette (4.6.). Sviluppare la colorazione come indicato in 5.4., primo paragrafo. Indi misurare le densità ottiche a 545 nm contro acqua. Tracciare la curva di taratura portando in ordinata i valori della densità ottica e in ascissa le quantità corrispondenti di sulfachinossalina in microgrammi.

6. CALCOLO DEI RISULTATI.

Il contenuto di sulfachinossalina in mg per kg di campione e data dalla formula:

$$\frac{A}{P} \cdot 50$$

dove:

A = quantità in microgrammi di sulfachinossalina determinata con la misurazione fotometrica,

P = peso in grammi del campione prelevato per l'analisi.

7. RIPETIBILITÀ.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

10 ppm, in valore assoluto per concentrazioni di sulfachinossalina comprese tra 20 e 100 ppm;

10 % del risultato più elevato per le concentrazioni comprese tra 100 e 5000 ppm;

500 ppm, in valore assoluto, per concentrazioni comprese tra 5000 e 10000 ppm;

5 % del risultato più elevato per le concentrazioni superiori a 10000 ppm.

Determinazione del furazolidone

[N-(5-nitro-2-furfurilidene)-3-ammino-2-ossazolidone]
oppure
[3-(5-nitrofurfurilidenammino)-ossazolidin-2-one]

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il metodo permette di determinare il contenuto di furazolidone negli alimenti per gli animali, nei concentrati e nelle premiscele. Il limite inferiore di applicabilità è di 10 ppm.

2. PRINCIPIO.

Il furazolidone è estratto con acetone previo allontanamento dei grassi mediante estrazione con etere di petrolio.
L'estratto viene purificato per cromatografia su colonna di ossido di alluminio e il furazolidone è eluito con acetone. L'eluato viene evaporato a secco e il residuo è ripreso con alcole amilico. Si estrae quindi il furazolidone puro con una soluzione di urea e la densità ottica dell'estratto è misurata a 375 nm.

3. REATTIVI.

3.1. *Acetone p.a.*

3.2. *Ossido di alluminio per cromatografia*, neutro, grado di attività I, granulometria da 100 a 240 mesh, preparato come segue: mescolare 500 g di ossido di alluminio con 1 litro di acqua distillata calda e separare il liquido di superficie. Ripetere due volte l'operazione e filtrare quindi su Buchner. Essiccare l'ossido di alluminio a 105° C fino a peso costante.

3.3. *Acetato di amile p.a.*

3.4. *Alcole amilico p.a.* (sono idonee le miscele di isomeri).

3.5. *Etere di petrolio p.eb.* 40-60° C.

3.6. *soluzione di urea*: mescolare 90 g di urea p.a. con 100 ml d'acqua, riscaldare leggermente per ottenere lo scioglimento completo.

3.7. *Sostanza tipo*: furazolidone puro.

3.8. *Soluzione di riferimento*: pesare, con l'approssimazione di 0,1 mg, 25 mg di sostanza tipo (3.7.). Sciogliere nell'acetone (3.1.) in un pallone tarato da 250 ml (4.1.), portare a volume con acetone e omogeneizzare. La soluzione contiene 100 µg di furazolidone per ml.

4. APPARECCHIATURE.

4.1. *Palloni tarati di vetro bruno, da 100 e 250 ml.*

4.2. *Imbuti separatori di vetro bruno da 100 ml.*

4.3. *Estrattori Soxhlet o equivalenti.*

4.4. *Cartucce da estrazione da 25 × 80 mm o 28 × 100 mm.*

4.5. *Colonne per cromatografia di vetro, del diametro interno di 10 mm e della lunghezza di circa 300 mm.*

4.6. *Bagno d'acqua bollente.*

4.7. *Spettrofotometro con vaschetta di 10 mm di cammino ottico.*

5. MODO DI OPERARE.

N.B. — Tutte le operazioni devono essere effettuate al riparo dalla luce diretta.

5.1. *Preparazione del campione.*

Macinare il campione in modo che passi totalmente attraverso un setaccio a maglie di 1 mm (conforme alla raccomandazione ISO R 565).

5.2. *Estrazione.*

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, da 5 a 20 g del campione, macinato e omogeneizzato (contenente al massimo 1 mg di furazolidone), in una cartuccia da estrazione (4.4.), introdurre la cartuccia in un estrattore (4.3.) ed estrarre con etere di petrolio (3.5.). Con l'apparecchio di Soxhlet sono necessari da 13 a 17 cicli di solvente; con altri apparecchi la durata di estrazione non deve essere inferiore a 30 minuti. Ritirare quindi la cartuccia dall'apparecchio, eliminare il solvente residuo ed asciugare la cartuccia e il contenuto in corrente d'aria calda.
Porre la cartuccia e il contenuto in un estrattore pulito, estrarre con l'acetone (3.1.). Con l'apparecchio di Soxhlet sono necessari almeno 25 cicli di solvente; con altri apparecchi occorre determinare preventivamente le condizioni necessarie per ottenere un'estrazione completa. Evaporare l'estratto acetonico sul bagno d'acqua (4.6.) fino a un volume di 5-10 ml. Lasciar raffreddare fino a temperatura ambiente.

5.3. *Cromatografia.*

Introdurre un tampone di lana di vetro nell'estremità inferiore di una colonna per cromatografia (4.5.) e comprimere il tampone con una bacchetta adeguata fino ad ottenere uno spessore di 2-3 mm. Preparare una sospensione di ossido di alluminio (3.2.) nell'acetone (3.1.), introdurre la sospensione nella colonna e lasciar sedimentare. La colonna così ottenuta deve avere un'altezza di circa 200 mm. Lasciar scendere l'acetone fino alla superficie superiore della colonna.
Travasare nella colonna l'estratto acetonico ottenuto come descritto sub 5.2., lavare il flacone a più riprese con acetone (3.1.) e travasare i liquidi nella colonna. Porre la colonna sopra un flacone adeguato ed eluire il furazolidone con acetone (3.1.). Il volume totale di acetone da utilizzare, compreso quello impiegato per il lavaggio, deve essere di circa 150 ml.

5.4. *Estrazione e misura della densità ottica.*

Evaporare l'eluato, ottenuto secondo quanto indicato sub 5.3., fino a secco su bagno d'acqua (4.6.). (Occasionalmente si ottiene una piccola quantità di diacetone-alcole, prodotto per condensazione di acetone sull'ossido di alluminio, che tuttavia non impedisce le estrazioni successive). Riprendere con 10 ml di alcole amilico (3.4.) e travasare la soluzione in un imbuto separatore (4.2.). Lavare il flacone con 10 ml di acetato di amile (3.3.) e successivamente con 10 ml di soluzione di urea (3.6.), travasare le soluzioni nell'imbuto separatore e agitare vigorosamente per 2 minuti.
Lasciar riposare per 3-4 minuti e raccogliere quindi la fase acquosa in un pallone tarato da 100 ml (4.1.). Ripetere il lavaggio e l'estrazione con 4 porzioni di 10 ml di soluzione di urea (3.6.) e raccogliere ogni volta la fase acquosa nel pallone tarato. Portare il contenuto del pallone a 100 ml con la soluzione di urea (3.6.) e mescolare. Misurare la densità ottica della soluzione allo spettrofotometro (4.7.) a 375 nm usando come bianco la soluzione di urea (3.6.). Determinare la quantità di furazolidone riferendosi alla curva di taratura (5.5.).

5.5. *Curva di taratura.*

Preparare 4 colonne cromatografiche secondo il modo di operare indicato sub 5.3., primo comma. Introdurre con la pipetta nelle colonne volumi rispettivi di 2,5 - 5,0 - 7,5 e 10,0 ml della soluzione di riferimento (3.8.). Eluire ogni colonna con 150 ml di acetone (3.1.) e continuare ad operare come indicato sub 5.4. Tracciare la curva di taratura portando in ordinata i valori della densità ottica e in ascissa le quantità corrispondenti di furazolidone in microgrammi.

6. CALCOLO DEI RISULTATI.

Il contenuto di furazolidone in milligrammi per chilogrammo di campione è dato dalla formula:

$$\frac{A}{P}$$

dove:

A = quantità in microgrammi di furazolidone determinata fotometricamente,

P = peso in grammi del campione prelevato per l'analisi.

7. RIPETIBILITÀ.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione non deve superare:

50 % del risultato più elevato per concentrazioni di furazolidone comprese tra 10 e 20 ppm;

10 ppm, in valore assoluto, per le concentrazioni comprese tra 20 e 100 ppm;

10 % del risultato più elevato per le concentrazioni comprese tra 100 e 5.000 ppm;

500 ppm, in valore assoluto, per le concentrazioni comprese tra 5.000 e 10.000 ppm;

5 % del risultato più elevato per le concentrazioni superiori a 10.000 ppm.

Determinazione dell'aflatossina B_1

A. — *Metodo per cromatografia monodimensionale su strato sottile*

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il metodo consente di determinare il contenuto di aflatossina B_1 dei seguenti alimenti: panelli di arachidi, di copra, di lino, di soia, di sesamo, di babassu e di germi di granturco, cereali e prodotti a base di cereali, farina di piselli, polpa e fecola di patate. Il limite inferiore di determinazione è di 0,01 mg/Kg (10 ppb).

In presenza di sostanze interferenti che intralciano le determinazioni, occorre ripetere l'analisi secondo il metodo B (cromatografia bidimensionale su strato sottile).

2. PRINCIPIO.

Il campione è sottoposto ad estrazione con cloroformio. L'estratto viene filtrato e un'aliquota viene purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluato viene evaporato e il residuo ripreso con un volume determinato di cloroformio o di una miscela di benzene e acetonitrile. Un'aliquota della soluzione è sottoposta a cromatografia su strato sottile. La quantità di aflatossina B_1 è determinata irradiando la lastra con radiazioni UV, sia visualmente sia mediante fluorodensitometria, in rapporto a quantità note di aflatossina B_1.

L'identità di aflatossina B_1 estratta dall'alimento deve essere confermata con i procedimenti indicati.

3. REATTIVI.

Nota: Tutti i reattivi, in mancanza di altre indicazioni, devono essere del tipo « per analisi ».

3.1. *Acetone.*

3.2. *Cloroformio, stabilizzato con* 0,5-1,0% *di etanolo al* 96% (*v/v*).

3.3. *n-Esano.*

3.4. *Metanolo.*

3.5. *Etere etilico anidro, esente da perossidi.*

3.6. *Miscela benzene/acetonitrile*: 98/2 (*v/v*).

3.7. *Miscela cloroformio* (3.2)/*metanolo* (3.4): 97/3 (*v/v*).

3.8. *Gel di silice, per cromatografia su colonna, granulometria*: 0,05/0,20 mm.

3.9. *Cotone idrofilo, preventivamente sgrassato col cloroformio, o lana di vetro.*

3.10. *Solfato di sodio, anidro, granulato.*

3.11. *Gas inerte, ad esempio azoto.*

3.12. *Acido cloridrico* 1 N.

3.13. *Acido solforico al* 50% (*v/v*).

3.14. *Terra di diatomee* (*Hiflosupercel*), *lavata con acido.*

3.15. *Gel di silice G-HR o equivalente, per cromatografia su strato sottile.*

3.16. *Soluzione standard contenente* 0,1 µg *circa di aflatossina B_1 per ml in cloroformio* (3.2) *o in miscela benzene/acetonitrile* (3.6), *preparata e controllata come indicato al punto* 7.

3.17. *Soluzione standard qualitativa contenente* 0,1 µg *circa di aflatossina B_1 e B_2 per ml in cloroformio* (3.2) *o in miscela benzene/acetonitrile* (3.6). Tali concentrazioni sono riferite a titolo indicativo. Esse devono essere adattate in modo da ottenere su lastra cromatografica la stessa intensità di fluorescenza per le due aflatossine.

3.18. *Solventi di sviluppo*:

3.18.1 Cloroformio (3.2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v), vaschetta non satura.

3.18.2 Etere etilico (3.5)/metanolo (3.4)/acqua: 96/3/1 (v/v/v), vaschetta non satura.

3.18.3 Etere etilico (3.5)/metanolo (3.4)/acqua: 94/4,5/1,5 (v/v/v), vaschetta satura.

3.18.4 Cloroformio (3.2)/metanolo (3.4): 94/6 (v/v), vaschetta satura.

3.18.5 Cloroformio (3.2)/metanolo (3.4): 97/3 (v/v), vaschetta satura.

4. APPARECCHIATURA.

4.1. *Tritatore mescolatore.*

4.2. *Scuotitore o agitatore magnetico.*

4.3. *Filtri a pieghe, Schleicher e Schüll, n.* 588 *o equivalente, diam.* 24 *cm.*

4.4. *Colonne per cromatografia, in vetro* (*diametro interno*: 22 *mm, altezza*: 300 *mm*), *con rubinetto di teflon e serbatoio da* 250 *ml.*

4.5. *Evaporatore rotante sotto vuoto, provvisto di pallone a fondo rotondo da* 500 *ml.*

4.6. *Beute da* 500 *ml, con tappo smerigliato.*

4.7. *Apparecchiatura per cromatografia su strato sottile.*

4.8. *Lastre di vetro per cromatografia su strato sottile,* 200 X 200 *mm, preparate come segue* (le quantità indicate sono sufficienti per ricoprire 5 lastre): introdurre 30 g di gel di silice G-HR (3.15) in una beuta, aggiungere 60 ml di acqua, tappare e agitare per un minuto. Stendere la sospensione sulle lastre in modo da ottenere uno strato uniforme di 0,25 mm di spessore. Lasciar asciugare all'aria e conservare in seguito in essiccatore munito di gel di silice. Al momento dell'uso, attivare le lastre ponendole per una ora in stufa a 110°C.

Le lastre in commercio pronte per l'uso possono essere impiegate se danno risultati simili a quelli delle lastre preparate come sopra indicato.

4.9. *Lampada UV a onde lunghe* (360 *nm*). L'intensità di irradiazione deve consentire di distinguere nettamente, sulla lastra cromatografica, una macchia di 1,0 ng di aflatossina B_1 su strato sottile, ad una distanza di 10 cm dalla lampada.

4.10. *Cilindri graduati da* 10 *ml con tappi in polietilene.*

4.11. *Spettrofotometro UV.*

4.12. *Fluorodensitometro* (eventualmente).

5. MODO DI OPERARE.

5.1. *Preparazione del campione* (cfr. parte *C*, punto 1).

Macinare il campione in modo che passi completamente attraverso un setaccio a maglie di 1 mm (conforme alla raccomandazione ISO R 565).

5.2. *Estrazione.*

Introdurre 50 g del campione macinato e omogeneizzato in una beuta da 500 ml (4.6). Aggiungere 25 g di terra di diatomee (3.14), 25 ml di acqua e 250 ml di cloroformio (3.2). Tappare la beuta, scuotere o agitare per 30 minuti con l'apposito apparecchio (4.2) e filtrare su filtro a pieghe (4.3). Eliminare i primi 10 ml di filtrato e raccogliere i successivi 50 ml.

5.3. *Purificazione su colonna.*

Porre un tampone di cotone o di lana di vetro (3.9) all'estremità inferiore di una colonna per cromatografia (4.4), riempire di cloroformio (3.2) i due terzi della colonna e aggiungere 5 g di solfato di sodio (3.10).

Controllare che la superficie superiore dello strato di solfato di sodio sia piana, quindi aggiungere un poco alla volta 10 g di gel di silice (3.8). Scuotere la colonna con precauzione dopo ogni aggiunta per eliminare le bolle d'aria. Lasciar depositare per 15 minuti e aggiungere quindi con precauzione 15 g di solfato di sodio (3.10). Lasciar defluire il liquido dalla colonna fino a che ne rimanga un sottile strato sulla superficie del solfato di sodio.

Mescolare i 50 ml di estratto raccolti al punto 5.2 con 100 ml di n-esano (3.3) e travasare quantitativamente la miscela nella colonna. Lasciar defluire il liquido sino alla superficie superiore dello strato di solfato di sodio. Aggiungere quindi 100 ml di etere etilico (3.5) e lasciar defluire anche questi sino alla superficie superiore dello strato di solfato di sodio. Durante queste operazioni, controllare che la velocità di deflusso sia di 8-12 ml al minuto e che la colonna non rimanga a secco. Eliminare i liquidi defluiti. Eluire quindi con 150 ml della miscela cloroformio/metanolo (3.7) e raccogliere tutto l'eluato.

Evaporare l'eluato quasi a secco, in corrente di gas inerte (3.11) e ad una temperatura non superiore a 50°C, con l'evaporatore rotante sotto vuoto (4.5). Trasferire quantitativamente il residuo, usando il cloroformio (3.2) o la miscela benzene/acetonitrile (3.6), in un cilindro graduato da 10 ml (4.10). Concentrare la soluzione in corrente di gas inerte (3.11) e portare quindi il volume a 2 ml con cloroformio (3.2) o con la miscela benzene/acetonitrile (3.6).

5.4. *Cromatografia su strato sottile.*

Deporre per punti su una lastra per cromatografia su strato sottile (4.8) a 2 cm dal bordo inferiore e ad intervalli di 2 cm, i volumi sotto indicati della soluzione standard e dell'estratto:

10, 15, 20, 30 e 40 µl della soluzione standard di aflatossina B_1 (3.16);

10 µl dell'estratto ottenuto al punto 5.3 e, *in sovrapposizione sullo stesso punto*, 20 µl della soluzione standard (3.16);

10 e 20 µl dell'estratto ottenuto al punto 5.3.

Sviluppare il cromatogramma al riparo dalla luce, impiegando uno dei solventi di sviluppo (3.18). La scelta del solvente deve essere stabilita preventivamente deponendo sulla lastra 25 µl della soluzione standard qualitativa (3.17) e accertando che, dopo lo sviluppo, le aflatossine B_1 e B_2 siano completamente separate.

Lasciare evaporare i solventi al riparo dalla luce e quindi irradiare, con la lampada UV, la lastra posta a 10 cm dalla lampada (4.9). Le macchie di aflatossina B_1 danno una fluorescenza blu.

5.5. *Determinazioni quantitative.*

Procedere alle determinazioni, sia visualmente sia mediante fluorodensitometria, come sotto indicato.

5.5.1. Misurazioni visuali. Determinare la quantità di aflatossina B_1 dell'estratto comparando l'intensità di fluorescenza delle macchie dell'estratto con quella delle macchie della soluzione standard. Interpolare se necessario. La fluorescenza della macchia corrispondente alla sovrapposizione dell'estratto alla soluzione standard deve essere più forte di quella dei 10 µl di estratto e deve dar luogo alla percezione di una sola macchia. Se l'intensità di fluorescenza data dai 10 µl di estratto è più forte di quella dei 40 µl di soluzione standard, diluire l'estratto 10 o 100 volte con cloroformio (3.2) o con la miscela benzene/acetonitrile (3.6) prima di sottoporlo ad una nuova cromatografia su strato sottile.

5.5.2. Misure fluorodensitometriche. Misurare l'intensità di fluorescenza delle macchie di aflatossina B_1 con il fluorodensitometro (4.12), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm ed una lunghezza d'onda di emissione di 443 nm. Determinare la quantità di aflatossina B_1 dei depositi dell'estratto confrontando le intensità di fluorescenza delle macchie dell'estratto e della soluzione standard.

5.6. *Conferma dell'identità dell'aflatossina B_1.*

Confermare l'identità dell'aflatossina B_1 dell'estratto con i seguenti procedimenti:

5.6.1. Trattamento con acido solforico. Nebulizzare acido solforico (3.13) sul cromatogramma ottenuto al punto 5.4. La fluorescenza delle macchie di aflatossina B_1 deve volgere dal blu al giallo sotto irradiazione UV.

5.6.2. Cromatografia bidimensionale implicante la formazione di aflatossina B_1-emiacetale (aflatossina $B_{2}a$).

N.B. Le operazioni sotto descritte devono essere effettuate seguendo lo schema riprodotto nella figura 1.

5.6.2.1 Applicazione delle soluzioni. Tracciare su una lastra (4.8) due linee parallele a due lati contigui (a distanza di 6 cm da tali lati), destinate a delimitare la migrazione dei fronti dei solventi. Deporre sulla lastra, con pipette capillari o con microsiringhe, le soluzioni sotto indicate:

nel punto *A*: un volume di estratto purificato del campione ottenuto al punto 5.3, corrispondente a circa 2,5 nanogrammi di aflatossina B_1;

nei punti *B* e *C*: 25 µl della soluzione standard (3.16).

5.6.2.2. Sviluppo. Sviluppare il cromatogramma nella direzione I usando il solvente di sviluppo (3.18.1) (strato di 1 cm in vaschetta non satura), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Togliere la lastra dalla vaschetta e lasciarla asciugare per 5 minuti al riparo dalla luce e a temperatura ambiente. Nebulizzare quindi acido cloridrico (3.12.) su una striscia di 2,5 cm di altezza che comprende i punti A e B (tratteggiata nella figura 1) sino ad imbrunimento, proteggendo il resto della lastra con un vetro. Lasciare reagire per 10 minuti all'oscuro ed asciugare con una corrente d'aria a temperatura ambiente.

Sviluppare quindi il cromatogramma nella direzione II usando il solvente di sviluppo (3.18.1.) (strato di 1 cm in vaschetta non satura), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Togliere la lastra dalla vaschetta e lasciarla asciugare a temperatura ambiente.

5.6.2.3. Interpretazione del cromatogramma. Esaminare il cromatogramma sotto la lampada UV (4.9.) e verificare le osservazioni seguenti:

a) comparsa di una macchia fluorescente blu di aflatossina B_1 proveniente dalla soluzione standard deposta nel punto *C* (migrazione nella direzione I).

b) comparsa di una macchia fluorescente blu di aflatossina B_1 (che non ha reagito con l'acido cloridrico) e di una macchia fluorescente blu più intensa di aflatossina B_1-emiacetale proveniente dalla soluzione standard deposta nel punto *B* (migrazione nella direzione II).

c) comparsa di macchie simili a quelle descritte al punto *b*), provenienti dall'estratto del campione deposto nel punto *A*. La posizione di tali macchie è definita dalla distanza di migrazione della aflatossina B_1 a partire dal punto *A* nella direzione I (distanza uguale a quella percorsa dall'aflatossina B_1 della soluzione standard deposta nel punto *C*), seguita dalle distanze di migrazione percorse nella direzione II dall'aflatossina B_1 (che non ha reagito con l'acido cloridrico) e dall'aflatossina B_1-emiacetale (distanze uguali a quelle percorse dalle aflatossine della soluzione standard deposta nel punto *B*). Le intensità di fluorescenza delle macchie di emiacetale proveniente dall'estratto e dalla soluzione standard deposta nel punto *B* dovrebbero corrispondere.

6. CALCOLO DEI RISULTATI.

6.1. *Partendo da misurazioni visuali.*

Il contenuto in microgrammi di aflatossina B_1 per kg di campione (ppb) è dato dalla formula

$$\frac{C \cdot Y \cdot V}{P \cdot X}$$

dove:

Y e X sono rispettivamente i volumi in microlitri della soluzione standard di aflatossina B_1 (3.16) e dell'estratto, che depositati su lastra danno macchie aventi uguale intensità di fluorescenza;

C = concentrazione in microgrammi di aflatossina B_1 per ml della soluzione standard (3.16);

V = volume finale dell'estratto in microlitri, tenuto conto delle eventuali diluizioni;

P = peso in grammi della quantità di sostanza sottoposta ad analisi, corrispondente al volume di estratto sottoposto a purificazione su colonna.

6.2. *Partendo da misurazioni fluorodensitometriche.*

Il contenuto in microgrammi di aflatossina B_1 per kg di campione (ppb) è dato dalla formula

$$\frac{C \cdot V}{P \cdot X}$$

dove:

X = volume in microlitri dell'estratto deposto sulla lastra (10 o 20 µl);

C = quantità in nanogrammi di aflatossina B_1 presente nel volume X depositato sulla lastra e calcolata con la misura fluorodensitometrica;

V = volume finale dell'estratto in microlitri, tenuto conto delle eventuali diluizioni;

P = peso in grammi della quantità di sostanza sottoposta ad analisi, corrispondente al volume di estratto sottoposto a purificazione su colonna.

7. PREPARAZIONE E CONTROLLO DELLA SOLUZIONE STANDARD (3.16).

7.1. *Determinazione della concentrazione in aflatossina B_1.*

Preparare una soluzione standard di aflatossina B_1 in cloroformio (3.2) o in miscela benzene/acetonitrile (3.6), con concentrazione di 8-10 µg per ml. Registrare lo spettro di assorbimento tra 330 e 370 nm mediante lo spettrofotometro (4.11).

Rilevare la densità ottica (A) a 363 nm per la soluzione cloroformica, a 348 nm per la soluzione in miscela benzene/acetonitrile.

Calcolare la concentrazione in microgrammi di aflatossina B_1 per ml di soluzione, con le seguenti formule:

per la soluzione cloroformica

$$\frac{312 \,.\, A \,.\, 1000}{20600}$$

per la soluzione in miscela benzene/acetonitrile

$$\frac{312 \,.\, A \,.\, 1000}{19800}$$

Effettuare al riparo dalla luce le opportune diluizioni per ottenere una soluzione standard di lavoro con concentrazione di circa 0,1 µg di aflatossina B_1 per ml. Conservata in frigorifero a 4°C, questa soluzione rimane stabile per due settimane.

7.2. *Controllo della purezza cromatografica.*

Deporre su una lastra (4.8) 5 µl della soluzione standard contenente 8-10 µg di aflatossina B_1 per ml (cfr. 7.1). Sviluppare il cromatogramma come indicato al punto 5.4. Sottoponendo la lastra alle radiazioni UV si deve avere una sola macchia fluorescente e non deve percepirsi alcuna fluorescenza nel punto di partenza.

8. RIPETIBILITÀ.

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate in parallelo sullo stesso campione dallo stesso analista non dovrebbe superare:

25 % del risultato più elevato per i contenuti in aflatossina B_1 da 10 a 20 µg/Kg;

5 µg, in valore assoluto, per i contenuti compresi tra 20 e 50 µg/Kg;

10 % del risultato più elevato per i contenuti superiori a 50 µg/Kg.

9. RIPRODUCIBILITÀ.

cfr. note, parte *C*, punto 2.

B. *Metodo per cromatografia bidimensionale su strato sottile*

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Il metodo consente di determinare il contenuto di aflatossina B_1 degli alimenti per gli animali non rientranti nel campo di applicazione del metodo A. Il limite inferiore di determinazione è di 0,01 mg/Kg (10 ppb). Questo metodo non si applica agli alimenti contenenti polpe di agrumi.

2. PRINCIPIO.

Il campione è estratto con cloroformio. L'estratto viene filtrato e un'aliquota viene prelevata e purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice. L'eluato viene evaporato e il residuo è ripreso con un volume determinato di cloroformio o di miscela benzene/acetonitrile. Un'aliquota della soluzione è sottoposta a cromatografia bidimensionale su strato sottile. La quantità di aflatossina B_1 è determinata irradiando la lastra cromatografica con raggi UV, sia visualmente sia mediante fluorodensitometria, in rapporto á quantità note di aflatossina B_1.

L'identità dell'aflatossina B_1 estratta dall'alimento deve essere confermata con il procedimento indicato.

3. REATTIVI.

N.B. — Tutti i reattivi, in mancanza di altre indicazioni, devono essere del tipo « per analisi ».

3.1. *Acetone.*

3.2. *Cloroformio, stabilizzato con* 0,5-1% *di etanolo al* 96% (*v/v*).

3.3. *n-Esano.*

3.4. *Metanolo.*

3.5. *Etere etilico anidro, esente da perossidi.*

3.6. *Miscela benzene/acetonitrile*: 98/2 (*v/v*).

3.7. *Miscela cloroformio* (3.2)/*metanolo* (3.4): 97/3 (*v/v*).

3.8. *Gel di silice, per cromatografia su colonna, granulometria*: 0,05/0,20 mm.

3.9. *Cotone idrofilo, preventivamente sgrassato con cloroformio o lana di vetro.*

3.10. *Solfato di sodio, anidro, granulato.*

3.11. *Gas inerte, ad esempio azoto.*

3.12. *Acido cloridrico* 1 *N.*

3.13. *Terra di diatomee* (Hiflosupercel), lavata con acido.

3.14. *Gel di silice G-HR o equivalente, per cromatografia su strato sottile.*

3.15. *Solventi di sviluppo*:

3.15.1. Etere etilico (3.5)/metanolo (3.4)/acqua: 94/4,5/1,5 (v/v/v) vaschetta satura.

3.15.2. Cloroformio (3.2)/acetone (3.1): 9/1 (v/v), vaschetta non satura.

3.16. *Soluzione standard* di 0,1 µg circa di aflatossina B_1 per ml in cloroformio (3.2) o nella miscela benzene/acetonitrile (3.6), preparata e controllata come indicato al punto 7 del metodo A.

4. APPARECCHIATURA.

Cfr. punto 4 del metodo A.

5. MODO DI OPERARE.

5.1. *Preparazione del campione*

5.2. *Estrazione*

5.3. *Purificazione su colonna*

cfr. punti 5.1., 5.2. e 5.3. del metodo *A*

5.4. *Cromatografia bidimensionale su strato sottile.*

5.4.1. Applicazione delle soluzioni (seguire lo schema riprodotto nella fig. 2). Tracciare su una lastra (4.8) due rette parallele a due lati contigui (a distanza di rispettivamente 5 e 6 cm da tali lati), destinate a delimitare la migrazione dei fronti dei solventi. Deporre sulla lastra con pipette capillari o con microsiringhe, le soluzioni sotto indicate:

nel punto A, 20 μl dell'estratto purificato del campione, ottenuto al punto 5.3;
nel punto *B*, 20 μl della soluzione standard (3.16);
nel punto *C*, 10 μl della soluzione standard (3.16);
nel punto *D*; 20 μl della soluzione standard (3.16);
nel punto *E*, 40 μl della soluzione standard (3.16).

Asciugare in leggera corrente d'aria o di gas inerte (3.11) Le macchie ottenute devono avere un diametro non superiore a 5 mm.

5.4.2. Sviluppo (seguire lo schema riprodotto nella fig. 2). Sviluppare il cromatogramma nella direzione I usando il solvente di sviluppo (3.15.1) (strato di 1 cm in vaschetta satura), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Togliere la lastra dalla vaschetta e lasciar asciugare per 15 minuti al riparo dalla luce e a temperatura ambiente.

Sviluppare quindi il cromatogramma nella direzione II usando il solvente di sviluppo (3.15.2) (strato di 1 cm in vaschetta non satura), al riparo dalla luce, finché il fronte del solvente non raggiunga la linea di delimitazione. Togliere la lastra dalla vaschetta e lasciar asciugare a temperatura ambiente.

5.4.3. Interpretazione del cromatogramma (seguire lo schema riprodotto nella fig. 3). Esaminare il cromatogramma sotto la luce UV collocando la lastra a 10 cm dalla lampada (4.9). Localizzare la posizione delle macchie con fluorescenza blu B, C, D ed E di aflatossina B_1 corrispondenti alla soluzione standard e tracciare due rette immaginarie passanti per tali macchie e perpendicolari alle direzioni di sviluppo. Il punto di intersezione P di tali rette rappresenta la posizione nella quale si dovrebbe trovare la macchia di aflatossina B_1 proveniente dall'estratto del campione deposto nel punto A (fig. 2). La posizione effettiva di questa macchia può, comunque trovarsi in un punto Q situato all'intersezione di due rette immaginarie formanti tra loro un angolo di circa 100 gradi e passanti rispettivamente per le macchie B e C. Determinare la quantità di aflatossina B_1 dell'estratto del campione come indicato al punto 5.5.

5.4.4. Cromatografia complementare. Tracciare su una nuova lastra (4.8) due rette parallele a due lati contigui, come indicato nello schema riprodotto nella fig. 2, e deporre nel punto *A* (cfr. fig. 2) 20 μl dell'estratto purificato del campione ottenuto al punto 5.3 e, ***in** sovrapposizione*, 20 μl della soluzione standard (3.16). Sviluppare come indicato al punto 5.4.2. Irradiare il cromatogramma con la luce UV (4.9) e verificare che:

le macchie di aflatossina B_1 dell'estratto e della soluzione standard si sovrappongano,

la fluorescenza di questa macchia sia più intensa di quella della macchia di aflatossina B_1 sviluppata nel punto Q della prima lastra.

5.5. *Determinazioni quantitative.*

Procedere alle determinazioni sia visualmente sia mediante fluorodensitometria come sotto indicato.

5.5.1. Misurazioni visuali. Determinare la quantità di aflatossina B_1 dell'estratto confrontando l'intensità di fluorescenza della macchia dell'estratto con quella delle macchie C, D ed E della soluzione standard. Interpolare, se necessario e se l'intensità di fluorescenza data dai 20 μl di estratto è più forte dei 40 μl di soluzione campione, diluire l'estratto 10 o 100 volte con cloroformio (3.2) o con la miscela benzene/acetonitrile (3.6) prima di sottoporlo ad una nuova cromatografia su strato sottile.

5.5.2. Misure fluorodensitometriche. Misurare l'intensità di fluorescenza delle macchie di aflatossina B_1 con il fluorodensitometro (4.12), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 365 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 443 nm.

Determinare la quantità di aflatossina B_1 presente nella deposizione dell'estratto confrontando le intensità di fluorescenza della macchia dell'estratto con quelle delle macchie C, D ed E della soluzione standard.

5.6. *Conferma dell'identità dell'aflatossina B_1.*
Cfr. punto 5.6. del metodo *A.*

6. CALCOLO DEI RISULTATI.

Cfr. punto 6 del metodo *A.*

7. RIPETIBILITÀ.

Cfr. punto 8 del metodo *A.*

8. RIPRODUCIBILITÀ.

Cfr. note, parte *C*, punto 2.

C. — *Note sui metodi* A e B

1. SGRASSATURA.

I campioni contenenti più del 5 % di sostanze grasse devono essere sgrassati con etere di petrolio (p.e. 40-60°) dopo aver effettuato la preparazione del campione come indicato al punto 5.1. I risultati devono essere comunque riferiti al peso del campione non sgrassato.

2. RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI.

La riproducibilità dei risultati, cioè la variazione tra i risultati ottenuti da due o più laboratori relativi allo stesso campione, è stata valutata a:

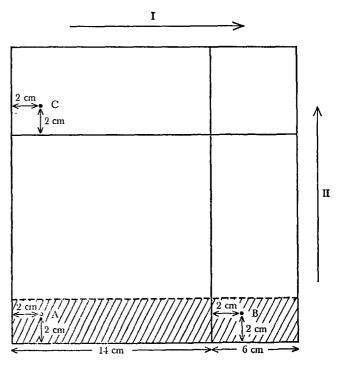
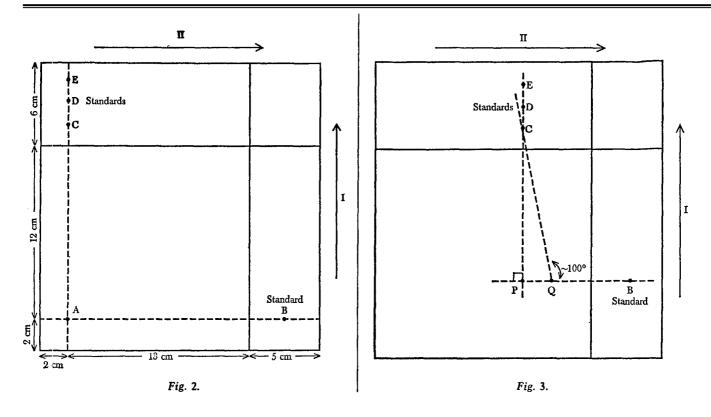
± 50 % del valore medio dei risultati per i valori medi in aflatossina B_1 da 10 a 20 μg/Kg;

± 10 μg/Kg del valore medio per i valori medi compresi tra 20 e 50 μg/Kg;

± 20 % del valore medio per i valori medi superiori a 50 μg/Kg.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Il Ministro per l'agricoltura e le foreste
MARCORA

(1883)

ANTONIO SESSA, *direttore* DINO EGIDIO MARTINA, *redattore*

(7651021/8) Roma - Istituto Poligrafico dello Stato - **S.**